

論文 / 著書情報
Article / Book Information

題目(和文)	アミノ酸由来側鎖分岐型ユニットを含むポリヒドロキシアルカン酸の生合成
Title(English)	Biosynthesis of Polyhydroxyalkanoate Containing Branched Side-Chain Unit Derived from Amino Acid
著者(和文)	雑賀あずさ
Author(English)	Azusa SAIKA
出典(和文)	学位:博士(工学), 学位授与機関:東京工業大学, 報告番号:甲第9493号, 授与年月日:2014年3月26日, 学位の種別:課程博士, 審査員:柘植 丈治,阿部 英喜,原 亨和,福居 俊昭,木賀 大介
Citation(English)	Degree:Doctor (Engineering), Conferring organization: Tokyo Institute of Technology, Report number:甲第9493号, Conferred date:2014/3/26, Degree Type:Course doctor, Examiner:,,,,
学位種別(和文)	博士論文
Category(English)	Doctoral Thesis
種別(和文)	要約
Type(English)	Outline

論文要約

【論文題目】

Biosynthesis of Polyhydroxyalkanoate Containing Branched Side-Chain Unit Derived from Amino Acid
(アミノ酸由来側鎖分岐型ユニットを含むポリヒドロキシアルカン酸の生合成)

【学生氏名】

雑賀あずさ (Azusa SAIKA)

【所属】

東京工業大学 大学院総合理工学研究科 物質科学創造専攻

【指導教員】

(主) 柘植丈治 (副) 阿部英喜

【論文要約】

ポリヒドロキシアルカン酸 (PHA) は、微生物が糖や植物油などの再生可能資源から生合成するバイオポリエステルである。最も代表的な PHA は、3-ヒドロキシブタン酸 (3HB) の単一重合体 P(3HB) であるが、これは結晶化度が高く、固くて脆いという物性上の欠点を有す。一方、側鎖分岐型モノマー、3-ヒドロキシ-4-メチル吉草酸 (3H4MV) を含む 3HB ベース共重合体は、3H4MV 分率 10 mol% 程度で低密度ポリエチレンに類似した柔軟な性質を示すことが分かっている^{1,2)}。しかし、糖質のみを炭素源として 3H4MV 共重合体を微生物合成した際の 3H4MV 分率は 0.5 mol% と低く、物性改善に十分な分率を達成するに至っていない。3H4MV 構造類似の脂肪酸の添加により 3H4MV 分率の増加が可能だが、これは菌体増殖阻害によるポリマー収量の低下を引き起こすため望ましくない。また、糖質から 3H4MV が生合成される経路もいまだ不明である。本論文では、これまで必須であった脂肪酸前駆体を添加せずに共重合体中の 3H4MV 分率を向上すべく、PHA 合成細菌 *Ralstonia eutropha* を宿主とした際の糖質からの 3H4MV 生合成経路の推定および強化、また大腸菌を宿主とした外来遺伝子を利用した 3H4MV 生合成経路の人工的構築の 2 つのアプローチを試みた。

まず *R. eutropha* を宿主とした系では³⁾、3H4MV 生合成と分岐アミノ酸代謝の関連に着目し、各分岐アミノ酸 (バリン, ロイシン, イソロイシン) の 3H4MV 分率増加効果について検証した結果、ロイシン添加の際に 3H4MV 分率が糖質のみの約 2 倍になることが分かった。この結果を受け、ランダム変異導入により作成した *R. eutropha* のロイシンアナログ耐性株を糖質単一条件下で培養したところ、耐性株のひとつ、1F2 株が糖質単一条件の際に 0.8 mol%, ロイシン 10 g/L 添加の際に 3.0 mol% と親株よりも高い 3H4MV 分率を示す共重合体を生合成した。これらの結果より、ロイシン過剰条件下において *R. eutropha* の 3H4MV 生合成が強化されることが明らかとなった。続いて糖質からの 3H4MV 生合成経路に関する更なる知見を得る目的で、*R. eutropha* と 1F2 株のゲノム解析を行った。その結果、1F2 株では分岐アミノ酸合成経路で機能する酵素に変異が導入されていることが判明し

た。この結果に基づき 1F2 株の改変を行ったところ、糖質のみを炭素源に用いても 3H4MV 分率を従来よりも高めることに成功した。

大腸菌を宿主とした系では、これまでとは別のアプローチとして、外来遺伝子を用いた人工的 3H4MV 生合成経路の構築を試みた⁴⁾。偏性嫌気性細菌 *Clostridium difficile* は、ロイシン分解経路の過程で、3H4MV の前駆体である 4-メチル-2-ペンテノイル CoA を合成する^{5,6,7)}。この経路に関わる *C. difficile* 由来ロイシン代謝遺伝子群と PHA 合成関連遺伝子群を利用し、ロイシンから 3H4MV を生合成する経路を構築した。この経路を導入した組換え大腸菌を糖質、およびロイシンを添加した条件で培養したところ、10 mol% 以上の 3H4MV を含む共重合体の生合成が確認された。加えて、糖質単一条件からの 3H4MV 共重合体生合成を目指し、ロイシン高生産大腸菌を宿主としたところ、糖質単一条件下でも 3H4MV 成分を含む共重合体を得ることに成功した。

【引用文献】

- 1) Tanadchangsang N, Kitagawa A, Yamamoto T, Abe H and Tsuge T. (2009) *Biomacromolecules*, 10: 2866-2874
- 2) Tanadchangsang N, Tsuge T and Abe H. (2010) *Biomacromolecules*, 11: 1615-1622
- 3) Saika A, Watanabe Y, Sudesh K, Abe H and Tsuge T. (2011) *AMB Express*, 1:6
- 4) Saika A, Watanabe Y, Sudesh K and Tsuge T. (2014) *J Biosci Bioeng*, *In press*.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiosc.2013.12.006>
- 5) Kim J, Hetzel M, Boiangiu CD and Buckel W. (2004) *FEMS Microbiol Rev*, 28: 445-468
- 6) Kim J, Darley D and Buckel W. (2005) *FEBS J*, 272: 550-561
- 7) Kim J, Darley D, Selmer T and Buckel W. (2006) *Appl Environ Microbiol*, 72: 6062-6069